

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1904-1905. — N° 41

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE
de l'Université de Lyon

ÉTUDE

SUR LA

COLORATION et la DÉCOLORATION

DES

Bacilles acido-résistants

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 7 Décembre 1904

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Yvan CAZOTTES

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE DE LYON

Né le 12 Juillet 1881, à Bourg-de-Visa (Tarn-et-Garonne)



LYON

Imprimerie WALTENER & C^{ie}

3, Rue Stella, 3

—
1904

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE
de l'Université de Lyon

ÉTUDE
SUR LA
COLORATION ET LA DÉCOLORATION
DES
Bacilles acido-résistants

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1904-1905. — N° 41

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE
de l'Université de Lyon

ÉTUDE

SUR LA

COLORATION et la DÉCOLORATION

DES

Bacilles acido-résistants

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 7 Décembre 1904

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Yvan CAZOTTES

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE DE LYON

Né le 12 Juillet 1881, à Bourg-de-Visa (Tarn-et-Garonne)



LYON

Imprimerie WALTENER & C^{ie}

3, Rue Stella, 3

1904

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. LORTET. DOYEN.
HUGOUNENQ. ASSESSEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PAULET, CHAUVÉAU

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. LÉPINE.
Cliniques chirurgicales	BONDET.
Clinique obstétricale et Accouchements.	BARD.
Clinique ophtalmologique	PONCET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	JABOULAY.
Clinique des maladies mentales	FABRE.
Clinique des maladies des enfants	X...
Physique médicale	AUGAGNEUR.
Chimie médicale et pharmaceutique	PIERRET.
Chimie organique et Toxicologie	WEILL.
Matière médicale et Botanique	MONOYER.
Parasitologie	HUGOUNENQ.
Anatomie	CAZENEUVE.
Anatomie générale et Histologie.	BEAUVISAGE.
Physiologie.	LORTET.
Pathologie interne.	TESTUT.
Pathologie externe.	RENAUT.
Pathologie et Thérapeutique générales	MORAT.
Anatomie pathologique	TEISSIER.
Médecine opératoire	X...
Médecine expérimentale et comparée.	MAYET.
Médecine légale	TRUPIER.
Hygiène	POLLOSSON (M.)
Thérapeutique.	ARLOING.
Pharmacologie	LACASSAGNE.
	COURMONT (J.)
	SOULIER.
	FLORENCE.

PROFESSEUR ADJOINT

Physiologie, cours complémentaire DOYON.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Clinique des maladies des femmes	MM. POLLOSSON (A.) agrégé
Maladie des voies urinaires	CHANDELUX, —
Maladies des oreilles, du nez et du larynx.	LANNOIS, —
Propédeutique médicale	ROQUE, —
Propédeutique chirurgicale	ROLLET, —
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN, —
Anatomie pathologique	DEVIC, —
Hygiène administrative	ROUX, —
Thérapeutique générale	COLLET, —
Accouchements	COMMANDEUR, —
Matière médicale	MOREAU, —
Embryologie	REGAUD, —
Anatomie topographique.	ANCEL, —

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
BARRAL.	BORDIER.	REGAUD.	GAYET.
PIC.	COURMONT (P.).	CAUSSE.	MOREL.
PAVIOT.	CHATIN.	ANCEL.	NEVEU-LEMAIRE.
NOVE-JOSSERAND.	VILLARD.	CHARVET.	NICOLAS.
BERARD.	TIXIER.	COMMANDEUR.	PATEL.
SAMBU.			

M. BAYLE, Secrétaire

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. ARLOING, *Président*; M. ROQUE, *Assesseur*;
MM. COURMONT (P.) et NICOLAS, *Agrégés*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE
LOUIS DEMATHIEU

MEIS ET AMICIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR ARLOING
Correspondant de l'Institut

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. COURMONT
Professeur agrégé, Médecin des Hôpitaux

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. NICOLAS
Professeur agrégé, Médecin des Hôpitaux

A MES MAÎTRES
De l'Ecole du service de Santé militaire

INTRODUCTION

On sait ce que sont les bacilles acido-résistants : ce sont des bactéries qui, après coloration, possèdent la propriété de résister à la décoloration par les acides. Dans ce groupe, rentrent le bacille de Koch et un grand nombre d'espèces dont nous nous proposons d'étudier les principales. Nous allons exposer rapidement l'histoire de leur découverte.

C'est Villemin, professeur au Val-de-Grâce, qui, le premier, démontra scientifiquement la spécificité de la tuberculose. Dans sa communication du 5 décembre 1865 à l'Académie de Médecine, il démontra que la tuberculose est réinoculable en séries. « Elle appartient à la classe des maladies virulentes et devra prendre place dans le cadre nosologique, à côté de la syphilis, mais plus près de la morve-farcin. » [61] (*). Villemin exposa nettement l'idée — géniale pour l'époque — d'un agent figuré, cause de la tuberculose. « Il faut, dit-il, la ranger parmi les affections dont on attribue l'existence à un germe morbide, capable de se multiplier dans l'écono-

(*) Les chiffres entre parenthèses renvoient à l'index bibliographique.

mie, et que, pour cette raison, on a appelées maladies zymotiques. » [62]

Les recherches de H. Martin [41] confirmèrent les résultats de Villemin.

Restait encore à découvrir l'agent spécifique de la tuberculose. R. Koch le met en évidence en mai 1882 [29], grâce à la découverte faite par Weigert et Ehrlich de l'action élective des couleurs basiques d'aniline sur le protoplasma microbien [30]. Le bacille tuberculeux semblait, à cette époque, présenter des caractères très particuliers, qui devaient lui assigner une place à part dans la flore microbienne. Comme le fait remarquer M. le professeur Jules Courmont « le bacille de Koch se colore plus difficilement et se décolore plus lentement par les acides minéraux que les autres microbes » [15] On le met facilement en évidence, grâce à un mordant ajouté à la solution colorante (potasse dans le procédé primitif de Koch ; — huile d'aniline dans le procédé d'Ehrlich ; — acide phénique dans le procédé de Ziehl et ses dérivés). Ce qui parut alors fort singulier, ce fut la propriété que possède le bacille tuberculeux de rester coloré après l'action d'un acide : comme le dit M. le professeur Arloing [2], « le bacille de Koch paraissait faire exception à tous les autres, en ne se décolorant pas par l'acide nitrique. »

Mais cette propriété de résister aux décolorants acides apparut bientôt comme commune à plusieurs espèces microbiennes. Neisser montra que le bacille décrit par Hansen en 1873 (*bacillus lepræ*) dans les nodules lépreux présente tous les caractères de coloration du bacille de Koch [15]. Plus tard, de nombreux expéri-

mentateurs cherchèrent à mettre en évidence le bacille tuberculeux dans les substances alimentaires — le lait surtout d'après Von Behring étant le grand agent propagateur de la phtisie [6, 7, 8]. Les résultats donnés par les divers auteurs présentèrent de grandes différences dans la teneur, en bacilles tuberculeux, du lait et des produits dérivés — divergences imputables sans doute à une technique différente et à l'état de tuberculose plus ou moins avancée des animaux. Mais la grande cause d'erreur, c'est que le lait, à côté du bacille de Koch, peut renfermer d'autres bactéries qui ont les mêmes réactions colorantes, surtout la propriété de résister aux décolorants acides. Koch et Petri [53] trouvèrent, dans le lait et le beurre de Berlin, des bacilles offrant au microscope les caractères du bacille tuberculeux (1896). M^{me} L. Rabinowitsch (1897) fit une découverte analogue dans le beurre de Berlin [55, 56, 57]. Möller décèle [42] dans le lait de Belzig, près Berlin, des microorganismes résistant à la décoloration par les acides. Les cinq variétés bactériennes décrites par M^{me} Tobler [60] dans le beurre de Zurich possèdent des propriétés identiques (1901). Korn [31, 32, 33] met en évidence, dans le beurre de Fribourg deux types de bacilles que leurs propriétés de coloration rapprochent du bacille de Koch. En 1899, Coggi [14] découvre, dans des échantillons du beurre milanais, un autre bacille résistant aux acides,

Des bactéries analogues furent trouvées dans la nature. Möller cherche à déceler la présence du bacille de Koch [43, 44, 45] sur les végétaux : il découvre sur la fléole des prés (*phleum-pratense* Timotheusgras) et dans la poussière sèche de certaines plantes, deux

variétés de bacilles résistants aux acides (Grasbacillus I et Grasbacillus II). Le même observateur décèle dans le fumier un bacille à propriétés analogues qu'il décrit sous le nom de Mistbacillus [46]. Divers auteurs, M^{me} Rabinowitsch [58], Pappenheim [52], Fränkel [22], Folli [21] ont trouvé, dans des crachats de gangrène pulmonaire, des bacilles résistant aux acides. On en a décelé d'autres dans le smegma préputial (Alvarez et Tavel, 1), le cérumen (Gottstein, 23), le mucus nasal (Karlinski, 28), dans certaines affections uro-génitales (Stolz, 59; Dietrich, 20; Laser et Czaplewski, 34, 19), dans le verruga du Pérou (Izquierdo, 27; Odriozola et Tamayo, 51; Letulle, 37; Nicolle, 48, 49; Lehmann et Neumann, 35).

Nous arrêtons ici la liste des bacilles résistant à la décoloration par les acides; nous n'avons cité que les plus importants d'entre eux.

On voit, par ce qui précède, comment l'étude de certains points particuliers de l'histoire du bacille tuberculeux — sa présence dans la nature — a fait découvrir d'autres micro-organismes à caractères de coloration similaires. Le bacille de Koch (Koch'scher bacillus, Tuberkelbacillus) doit être rangé, — au point de vue de la colorabilité — dans le même groupe que les bacilles ci-dessus, (Tuberkelähnliche Bacillen). Ceux-ci ont été désignés sous le nom d'« acidophiles », terme impropre auquel il vaut mieux substituer celui d'« acido-résistants » proposé par MM. P. Courmont et Potet [17, 54], traduction de la dénomination allemande « Säurefest » (qui résiste aux acides). Ce sont les « paratuberculibacilles » de M. le Professeur Arloing [54].

Nous nous proposons d'étudier, dans les pages qui suivent, la propriété caractéristique des bacilles acido-résistants, celle qui leur a valu leur appellation ; nous voulons parler de leur colorabilité. Suivant la remarque — paradoxale mais juste — de M. le professeur P. Courmont, la résistance de ces bacilles à la décoloration par les acides « est un des points les moins méthodiquement étudiés. » [17]. Il n'a paru jusqu'ici aucun travail d'ensemble sur ce point spécial de l'histoire des bacilles acido-résistants, « les différents auteurs ne s'étant pas toujours servis du même procédé de coloration ou du même acide décolorant. » [17]. Nous avons pris un certain nombre de ces bacilles — ceux qui nous ont paru les plus intéressants — dont nous avons examiné les diverses réactions colorantes, de façon à obtenir des résultats comparables entre eux.

Cette étude, forcément incomplète — le temps nous ayant fait défaut pour la poursuivre jusqu'au bout — nous a paru présenter un double intérêt, pratique et théorique. L'unicité des tuberculoses humaine et bovine est aujourd'hui admise presque sans conteste [3]. Il peut être d'une réelle utilité de déceler les bacilles tuberculeux dans le lait des bovidés, — la phtisie de l'adulte ressortissant, d'après Von Behring, à une infection intestinale de l'enfance transmise par le lait [6, 7, 8]. Or des bacilles acido-résistants, non pathogènes, peuvent venir fausser les résultats des recherches, comme c'est arrivé pour les premiers observateurs. D'autres fois, on observe, dans une urine purulente, des bacilles résistant à la décoloration par les acides : sont-ce des bacilles tuberculeux commandant une intervention chirurgicale.

ou bien a-t-on affaire à des bacilles du smegma, saprophytes vulgaires? La question vaut la peine d'être résolue [24]. Parfois enfin — cas de Rabinowitsch [58] — on trouve, dans l'expectoration d'un malade, des bacilles qui restent colorés après l'action des acides : s'agit-il de tuberculose ou de gangrène pulmonaire? Telle est la question qu'on a à résoudre. Existe-t-il un procédé vraiment clinique permettant de différencier le bacille de Koch des autres acido-résistants, par le simple examen de leurs réactions colorantes? C'est à la solution de ce problème que nous allons apporter notre modeste contribution.

Un autre côté non moins intéressant de cette étude — et qui nous fait entrer dans le domaine de la biologie générale — c'est la détermination des rapports qu'affecte le bacille tuberculeux avec les divers acido-résistants. Le bacille de Koch doit-il rester dans le « splendide isolement » [17] où l'avaient placé les premières recherches d'Ehrlich? Ou bien la résistance aux acides — nous dirions volontiers « l'acido-résistance » traduisant l'expression allemande de Säurefestigkeit — autorise-t-elle à considérer les acido-résistants et le bacille tuberculeux comme les divers échelons d'un même groupe, le bacille de Koch n'étant dans cette hypothèse qu'un acido-résistant devenu virulent et ayant acquis une spécificité fonctionnelle par une série d'adaptations successives?

Nous n'avons pas la prétention de donner à ces questions importantes une solution qui, dans l'état actuel de nos connaissances, nous apparaît comme prématurée. Nous nous proposons simplement en

étudiant de très près la coloration et la décoloration des acido-résistants — de voir les arguments qui militent en faveur de telle ou telle hypothèse.

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, qu'il nous soit permis d'exprimer ici nos sentiments de vive gratitude à M. le Professeur Arloing : il a bien voulu nous recevoir dans son laboratoire et nous fait le grand honneur de présider notre thèse inaugurale. M. le professeur agrégé Paul Courmont nous a donné l'idée de ce travail et nous a maintes fois aidé de ses conseils ; nous l'en remercions sincèrement. Nous avons souvent mis à contribution l'extrême obligeance de M. le Professeur agrégé Nicolas ; il a bien voulu siéger dans le jury de notre thèse : qu'il accepte l'expression de toute notre reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

Technique : Méthode et différents Procédés

CHAPITRE PREMIER

Méthode

Une des propriétés capitales du bacille de Koch et des autres bacilles acidophiles, comme on les appelait improprement autrefois, c'est leur résistance aux divers agents de décoloration. Cette propriété est due à une substance cireuse, grasse qu'on a pu extraire des corps bacillaires et qui, isolée à l'état amorphe, présente les caractères de coloration des bacilles acido-résistants (Bienstock, 10 ; Gottstein, 23 ; Bulloch, 12.) C'est cette substance grasse qui, entourant les bacilles comme un vernis ou intimement uni à leur protoplasma, a valu aux acido-résistants (Säurefest), leur dénomination.

MÉTHODE SUIVIE. — Nombreux sont les procédés préconisés pour l'étude comparative du degré d'acido-résistance dans les diverses espèces de bacilles. Celles-ci étant elles-mêmes très nombreuses, il importe de procéder d'une façon très méthodique, de recourir à une méthode rigoureuse. Les procédés que nous avons employés ont été essayés *parallèle-*

ment, le même jour, sur les bacilles de Koch et sur les autres acido-résistants.

Nous sommes partis du bacille tuberculeux (Bacille de Koch humain, en cultures solides, normales, classiques, sur agar glycérimé, âgées de 4 mois : échantillon H humain du laboratoire.) Avec les différents procédés, nous avons recherché le temps maximum d'action des décolorants qui ne décolore pas le bacille de Koch. Cette méthode, ce temps d'action ont été appliqués ensuite parallèlement aux autres bacilles acido-résistants : ce qui nous a permis de comparer les résultats obtenus.

On peut ranger en deux grandes catégories les procédés préconisés pour apprécier le degré d'acido-résistance (Säurefestigkeit) des différentes espèces. Ou bien, après coloration par la fuchsine phéniquée à chaud on soumet les bacilles à une *décoloration prolongée*. Ou bien on fait subir aux acido-résistants un *dégraissage préalable* par des agents appropriés : les bacilles sont ensuite colorés par la fuchsine phéniquée, puis décolorés rapidement. Les notions techniques étant indispensables à la compréhension des expériences qui suivent, nous allons exposer dans leurs détails les diverses méthodes. Nous allons tout d'abord décrire les procédés de coloration qui permettent simplement de déceler, de constater l'acido-résistance.

CHAPITRE II

Procédés ordinaires de coloration des bacilles acido-résistants

Comme l'avaient remarqué les premiers observateurs, le bacille de Koch se laisse colorer assez difficilement. D'où l'utilité d'ajouter à la substance colorante un mordant qui permette à celle-ci d'agir sur le corps microbien. Les procédés de coloration du bacille tuberculeux sont innombrables. Nous ne citerons brièvement que les plus importants d'entre eux. (Pour de plus amples détails, consulter l'ouvrage du professeur J. Courmont : Précis de bactériologie. 15).

1° *Procédé d'Ehrlich*. — La solution colorante est la suivante :

Eau d'aniline.....	100 cent. cubes	
Sol. alcoolique saturée		
de fuchsine.....	11	—

On décolore avec :

Acide nitrique.....	1	—
Eau.....	2 ou 3	

Le fond de la préparation est ensuite recoloré au bleu de méthylène.

2° *Procédé de Frænkel.* — Le premier temps est identique à celui du procédé d'Ehrlich. On décolore et on recolore dans une solution unique :

Alcool à 90°.....	50 grammes
Eau	50 —
Acide nitrique pur.....	20 —
Bleu de méthylène.....	en excès.

3° *Procédé de Gabbet.* — Bain colorant :

Fuchsine.....	1 gramme
Acide phénique.....	5 —
Alcool absolu.....	10 —
Eau	100 —

Deuxième bain (méthode substitutive) :

Acide sulfurique.....	25 grammes
Eau	100 —
Bleu de méthylène.....	1 à 2

4° *Procédés de Gibbs.* — Coloration élective en un seul temps. On traite les préparations par le liquide suivant :

Fuchsine.....	2 grammes
Bleu de méthylène.....	1 —
Aniline.....	3 cent. cubes
Alcool absolu.....	15 —
Eau distillée	15 —

On décolore à l'alcool (bacilles rouges, fond bleu).

5° *Procédé de Weigert.* — On colore avec le violet aniliné (solution d'Ehrlich) :

Solution alcoolique saturée de violet de gentiane ou de violet de méthyle.....	5 cent. cubes
Eau d'aniline.....	100 —

On traite par la solution de Lugol :

Iodure de potassium.....	2 grammes
Iode.....	1 —
Eau	300 —

Décoloration à l'huile d'aniline, puis lavage au xylol. Les bacilles sont colorés en violet foncé. Le procédé de Weigert

n'est autre que la méthode de Gram avec modification du dernier temps.

6° *Procédé de Hermann.* — Coloration à chaud par le mélange des deux solutions :

1°	{ Krystall violet.....	1 gramme
	{ Alcool à 95°.....	30 —
2°	{ Carbonate d'ammoniaque	1 gramme
	{ Eau distillée.....	100 —

Décoloration par l'acide nitrique dilué entre un dixième et un tiers. Recoloration à l'éosine.

7° *Procédé de Kühne.* — Coloration par le liquide de Ziehl. Décoloration par une solution d'aniline chlorhydrique à 2 p. $\frac{o}{100}$ puis par l'alcool. Toute la préparation, sauf les bacilles, est décolorée.

8° *Procédé de Ziehl-Neelsen.* — Coloration à chaud par la solution hydro-alcoolique de fuchsine phéniquée [47].

Fuchsine.....	1 gramme
Acide phénique cristallisé..	5 —
Eau distillée.....	100 —
Alcool absolu.....	10 —

(Dans le procédé primitif de Ziehl [63, 64] la solution colorante ne renfermait que 0 gr. 25 de fuchsine.)

Décoloration par la solution suivante :

Acide sulfurique.....	25 grammes
Eau.....	100 —

Recoloration du fond par le bleu de méthylène en solution aqueuse.

9° *Procédé de Ziehl-Hauser.* — On colore à chaud par la solution de Ziehl-Neelsen. On décolore par une solution alcoolique d'acide lactique à 3 p. $\frac{o}{100}$. Le fond est recoloré par une solution aqueuse de bleu de méthylène. Ce procédé est un des meilleurs. Il substitue, dans la décoloration, les acides organiques de la série lactique (acides lactique, citrique, tartrique) aux acides minéraux [25, 26, 36].

On voit, par l'exposé ci-dessus, que la plupart des procédés reposent sur les mêmes principes : mordant ajouté à la solution

colorante, décoloration par les acides. Ces divers procédés permettent de déceler indistinctement le bacille tuberculeux et les autres acido-résistants. Mais dans certains cas cliniques, il importe d'établir une diagnose différentielle entre le bacille de Koch et une espèce déterminée d'acido-résistants (*smegmabacillus* [24]; bacille de la gangrène pulmonaire de Rabinowitsch [58].) Il importe donc, non seulement de déceler la résistance aux acides (*Säurefestigkeit*) chez une espèce donnée, mais encore de mesurer cette résistance. Telle espèce perdra cette propriété par un dégraissage préalable ou une décoloration prolongée pendant un certain temps, alors que dans les mêmes conditions, d'autres bacilles restent teintés en rouge. Nous allons exposer maintenant les différents procédés permettant de doser, de mesurer la résistance à la décoloration par les acides.

CHAPITRE III

Procédés de décoloration prolongée pour mesurer l'acido-résistance

Dans les procédés destinés à déceler les divers acido-résistants (Ziehl-Neelsen, Ziehl-Hauser), les auteurs recommandent de faire agir rapidement la solution décolorante. Si l'on prolonge l'action de celle-ci, certains bacilles perdent leur coloration rouge et apparaissent ensuite bleus ou réfringents. C'est ainsi que l'on a préconisé l'action de nombreuses substances décolorantes.

I. **Chlorure de sodium** à 20 p. $\%$. Ce procédé a été appliqué par Stolz à un bacille trouvé dans une affection uro-génitale [59].

II. **Alcool absolu**. — (Bunge et Trantenroth, 13 ; Stolz, 59).

III. **Décolorants acides**. — Comme nous l'avons déjà dit, dans nos diverses recherches, nous avons envisagé la question au point de vue de ses applications cliniques. Chaque procédé a été appliqué d'abord au bacille de Koch dont nous avons cherché, par tâtonnements, à vaincre l'acido-résistance. La durée d'action qui laisse le bacille tuberculeux intact (rouge), et celle qui commence à le décolorer, ont été soigneusement

notées. Nous avons ensuite essayé sur les autres acido-résistants, les différents procédés avec cette durée d'action-limite qui ne décolorait pas encore le bacille de Koch.

a) ACIDES MINÉRAUX. — *L'acide nitrique* au tiers agissant pendant 10 minutes est sans action sur les bacilles de Koch (tuberculose humaine H du laboratoire: cultures solides, classiques sur gélose glycinée, âgées de 4 mois). Si l'on prolonge la décoloration pendant un quart d'heure, la majorité des bacilles sont décolorés. Nous avons donc fait agir sur les autres acido-résistants, l'acide azotique au tiers pendant 10 minutes.

L'acide chlorhydrique au tiers a été appliqué pendant une heure sur les diverses préparations (parce que ce temps d'action est sensiblement sans effets sur les bacilles de la tuberculose humaine H dans les conditions indiquées plus haut). Ce procédé a été spécialement appliqué par Letulle au bacille de la Verruga péruvienne [37].

L'acide sulfurique au quart est employé dans le procédé ordinaire de Ziehl-Neelsen. Nous l'avons fait agir pendant une heure sur les préparations pour différencier le bacille tuberculeux des autres acido-résistants.

b) ACIDES ORGANIQUES. — Les procédés qui suivent se ramènent au procédé de Ziehl-Hauser (substitution des acides organiques aux acides minéraux) avec cette seule différence que le temps de décoloration est plus long. On a ainsi préconisé divers acides.

L'acide citrique à 5 p. % a été employé sur le bacille tuberculeux de la carpe, de Dubard [18].

L'acide acétique glacial pur a été appliqué par Alvarez et Tavel au bacille du smegma [1].

Acide tartrique à 5 %, Folli l'emploie pour décolorer les bacilles acido-résistants qu'il trouve dans les foyers de gangrène pulmonaire [21].

Acide lactique. — Nous l'avons fait agir, en solution alcoolique à 3 p. %, pendant une heure sur les divers acido-résistants.

Tels sont, dans leur ensemble, les procédés de décoloration prolongée préconisés par de nombreux auteurs. Le temps dont nous disposions ne nous a pas permis d'appliquer toutes ces méthodes à la diagnose du bacille tuberculeux et des autres acido-résistants. Après coloration par le liquide de Ziehl à chaud, nous avons étudié en détail la décoloration par les acides minéraux (azotique, sulfurique, chlorhydrique) et par l'acide lactique : on trouvera, dans les chapitres qui suivent, l'exposé de nos résultats.

CHAPITRE IV

Procédés de dégraissage préalable pour mesurer l'acido-résistance.

Nombreux sont les procédés qui essayent de différencier le bacille de Koch des autres acido-résistants par la facilité plus ou moins grande avec laquelle ils abandonnent leur manteau graisseux.

I. *Procédé de Gottstein.* — Cet auteur [23] fait agir sur les préparations, avant toute coloration, une lessive de soude chaude, additionnée de 5 p. $\%$ d'alcool. Ce procédé, appliqué aux bacilles de smegma et de cérumen, leur fait perdre toute leur substance grasse, et par conséquent, leur résistance à la décoloration par les acides. Mais les expérimentateurs qui ont appliqué cette méthode [13] reconnaissent qu'elle est trop énergique, trop brutale : elle a l'inconvénient de détruire les bacilles acido-résistants (smegma-bacillus) et même les bacilles tuberculeux (Tuberkelbacillus) dans les crachats. Cela nous explique les critiques adressées au procédé d'*homogénéisation* des crachats ou des liquides fibrineux pour la recherche du bacille de Koch (Biedert). Cet auteur a en effet préconisé l'action d'une lessive de soude pour détruire la gangue fibri-

neuse qui soustrait le bacille tuberculeux aux agents de coloration [9]. Mais l'alcali ayant une action trop brutale les bacilles tuberculeux perdent leur acido-résistance et ne peuvent être décelés [39]. Dans nos recherches sur la colorabilité des bacilles acido-résistants, nous avons renoncé, pour les motifs indiqués ci-dessus, à l'emploi du procédé de Gottstein.

II. *Dégraissage préalable par l'éther sulfurique, le chloroforme ou l'eau chaude* (Kaufmann : 54, 18). — D'après Markuse [13] l'action de l'éther ne modifie nullement la coloration des bacilles.

Le chloroforme est sans action sur l'acido-résistance du bacille du cérumen (Gottstein, 13). Pour ces diverses raisons nous n'avons pas eu recours à ces procédés.

III. *Procédé de Bitter*. — Cet auteur emploie le traitement préalable des préparations par l'alcool et l'éther. Mais c'est là un procédé peu actif, puisque d'après Bunge et Trantenroth qui l'ont essayé, il n'arrive pas toujours à décolorer complètement le bacille du smegma [13].

IV *Procédé de Nikitine*. — On dégraisse les bacilles acido-résistants par l'acide chlorhydrique ou la potasse [50]. Ce procédé est passible des objections faites à celui de Gottstein : nous ne l'avons pas employé.

V. *Procédé de Bunge et Trantenroth*. — Ces deux auteurs, dans leur travail sur le bacille du smegma [13], préconisent le procédé suivant auquel ils se sont arrêtés après en avoir essayé plusieurs autres sans résultats satisfaisants.

Les préparations sont plongées pendant trois heures dans un bain d'alcool absolu, puis sont traitées pendant quinze minutes par une solution d'acide chromique à 5 p. ‰. On colore ensuite par la fuchsine phéniquée (carbol-fuchsin ; solution de Ziehl) à chaud jusqu'à l'émission des premières vapeurs. On laisse la substance colorante agir pendant cinq minutes. Les préparations sont ensuite décolorées par l'acide sulfurique dilué (25 p. ‰) pendant trois minutes. Puis on recolore le fond par une solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène qu'on laisse agir pendant cinq minutes au minimum.

VI. *Procédé spécial : dégraissage préalable par le sulfure de carbone.* — Le sulfure de carbone étant un dissolvant des graisses, nous avons eu l'idée de l'appliquer au dégraissage des bacilles acido-résistants. Mais les premiers essais auxquels nous nous sommes livrés ne nous ont pas d'abord paru concluants. Dans nos premières expériences, nous recolorions le fond des préparations — après dégraissage par CS_2 , coloration au Ziehl et décoloration par SO_3H^2 au quart — avec une solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène (3 p. $\%$). Ce procédé était trop énergique, puisqu'il décolorait la majorité des bacilles de Koch : il ne permettait pas de faire la diagnose différentielle du bacille tuberculeux et des autres acido-résistants. Après quelques tâtonnements, nous nous sommes arrêtés au procédé suivant :

Les préparations sont immergées pendant 4 minutes dans un bain de sulfure de carbone. Coloration par la fuchsine phéniquée à chaud : 5 minutes. Décoloration pendant trois minutes par l'acide sulfurique au quart. Le fond de la préparation est recoloré par une solution aqueuse de bleu de méthylène (pendant 5 minutes au moins).

Le dégraissage par le sulfure de carbone appliqué au bacille de Koch, pendant 4 minutes, est sans action sur ce dernier ; après 6 minutes, les bacilles commencent à se décolorer. Nous avons donc, dans nos recherches — dont nous exposons plus loin les résultats — fait agir le sulfure de carbone pendant 4 minutes sur les autres bacilles acido-résistants.

Telle est, dans son ensemble, la technique applicable aux bacilles réfractaires à la décoloration par les acides. Les procédés — on le voit par l'exposé qui précède — sont nombreux : certains présentent des inconvénients manifestes, nous les avons éliminés. Quant aux autres, le temps nous ayant manqué pour les appliquer tous, nous n'en avons essayé que quelques-uns. Toutes les préparations ont été fixées par la dessication simple, car, suivant la remarque de Markuse (13), ce procédé est préférable à la fixation par la flamme. Comme agent de coloration, nous avons employé la solution de Ziehl (carbol-

fuchsin, fuchsine phéniquée). Les diverses espèces d'acido-résistants (Säurefest) ont été soumises soit à une décoloration prolongée par les acides (minéraux : azotique au tiers, sulfurique au quart, chlorhydrique au tiers; organiques : acide lactique en solution alcoolique à 3 p. %), soit à un dégraissage préalable (alcool et acide chromique : Bunge et Trantenroth sulfure de carbone) combiné à une décoloration rapide. Ces notions préliminaires indispensables étant acquises, nous allons exposer dans leurs détails les résultats de nos recherches.

DEUXIÈME PARTIE

Des degrés de la résistance à la décoloration de chacun des bacilles dits « acido-résis- tants ».

Nous allons étudier, dans les lignes qui suivent, la façon dont les bacilles acido-résistants se comportent vis-à-vis des colorants et des agents de décoloration. Nos recherches n'ont pas porté sur l'ensemble des acido-résistants connus à l'heure actuelle. Nous indiquons ci-dessous, d'après la classification adoptée par MM. P. Courmont et Potet [17], les espèces que nous avons spécialement étudiées.

I. — Bacilles acido-résistants rencontrés chez l'homme

A. — NATURELLEMENT PATHOGÈNES

Bacille de la tuberculose (Koch).

B. — NON PATHOGÈNES (ou probablement)

1. « Bacilles trouvés chez l'homme sain »

Bacille du smegma.

2. « *Bacilles trouvés chez l'homme malade* »

Bacille de Rabinowitsch (trouvé dans la gangrène pulmonaire).

II. — **Bacilles acido-résistants des animaux**

1^o Bacille de la tuberculose bovine.

2^o Bacille de Möller (bacille de la pseudo-perlsucht de la vache).

3^o Bacille du fumier (Mistbacillus de Möller).

III. — **Bacilles acido-résistants du lait ou du beurre**

1^o Bacille de Rabinowitsch (beurre).

2^o Bacilles de Koch (types I et II), beurre.

3^o Bacille de Coggi (beurre).

4^o Bacilles de Tobler (types I, II, III, IV, V), beurre.

5^o Bacille du lait de Möller (Milchbacillus).

IV. — **Bacilles acido-résistants rencontrés
dans la nature**

I. — SUR LES PLANTES

a) Bacille des graminées I (de Möller), ou Grasbacillus I, Timotheebacillus, bacille de la fléole.

b) Bacille des graminées II (de Möller), ou Grasbacillus II.

2. DANS LE FUMIER (voir origine animale)

Mistbacillus de Möller.

§ I. — *Réactions colorantes du bacille
de la tuberculose humaine*

I. — **Bacilles trouvés dans les crachats.** — Nous avons, à plusieurs reprises, examiné la résistance aux

acides, que présentaient les bacilles trouvés dans les produits d'expectoration de tuberculeux avérés. Après coloration au Ziehl, l'action de l'acide sulfurique au quart pendant une heure, ou de l'acide nitrique au tiers pendant 15 minutes, était nulle vis-à-vis de ces bacilles qui restaient colorés d'un beau rouge. Comme on va le voir, par ce qui suit, les bacilles tuberculeux, pris même sur des cultures solides, présentent un commencement de décoloration lorsqu'on laisse l'acide nitrique agir plus de dix minutes. Il semble donc que, dans les crachats, les bacilles de Koch soient plus réfractaires aux agents de décoloration : cela tient peut-être à ce que le mucus et les débris de leucocytes forment une gangue protectrice qui s'oppose à l'action complète des acides.

II. — **Cultures de tuberculose H.** — 1. CULTURES SOLIDES, CLASSIQUES SUR AGAR GLYCÉRINÉ. — Nos recherches ont porté tout d'abord sur des *cultures solides* (*agar glycérimé*) de tuberculose H du laboratoire, prises à des tubes de pomme de terre glycérimée, et âgées de 4 mois environ.

a) COLORABILITÉ. *Méthode de Giacomi* [24]. — Les préparations ont été traitées par une simple solution aqueuse de fuchsine à 1 p. % (pas de mordant.) On les a placées sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à l'émission des premières vapeurs, puis on a laissé la solution colorante agir pendant cinq minutes. Après un lavage rapide, les préparations ont été plongées pendant dix minutes dans une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. %.

Dans ces conditions, les bacilles de la tuberculose H.

du laboratoire sont restés incolores : ils apparaissaient sous forme de bâtonnets réfringents.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Les lames portant les bacilles étalés à leur surface ont été traitées par une solution de violet de gentiane phéniqué, puis par le liquide de Lugol fort. Décoloration rapide par l'alcool-acétone, puis recoloration par une solution aqueuse de fuchsine à 1 p. ‰ (*Méthode de Gram-Nicolle.*)

Les bacilles de Koch ont pris le Gram, ont été teints en violet.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — Nous avons recherché la durée d'action maxima des différents acides, qui laisse intacts les bacilles tuberculeux après coloration par la fuchsine phéniquée. Au bout d'une heure, l'*acide sulfurique* au $\frac{1}{4}$ est sans action sur les bacilles de la tuberculose H, cultivés sur agar. L'*acide chlorhydrique* au $\frac{1}{3}$, agissant pendant une heure, est sensiblement inactif et laisse les bacilles tuberculeux teints en rouge. Avec l'*acide nitrique* au tiers, une action de dix minutes est sans effets sur la couleur des bacilles de Koch, alors qu'au bout de quinze minutes on observe une décoloration très avancée. L'*acide lactique* (en solution alcoolique à 3 p. ‰) agissant pendant une heure laisse les bacilles tuberculeux colorés en rouge ; au bout de deux heures, on remarque uu commencement de décoloration.

« *Procédés préalables de dégraissage* ». Le *procédé de Bunge et Trantenroth* (action de l'alcool-absolu et l'acide chromique, antérieure à toute coloration) laisse les bacilles tuberculeux intacts : leur couleur n'a pas à souffrir de ce traitement. Le dégraissage par le *sulfure de*

carbone appliqué pendant quatre minutes est sans action sur les bacilles de la tuberculose H ; à partir de six minutes, on constate un commencement de décoloration ; elle est complète au bout de quarante-cinq minutes.

2. CULTURES HOMOGÈNES. — Nous avons ensuite examiné la résistance aux acides, que présentait une culture de tuberculose H âgée de six jours,ensemencée plusieurs fois sur glycérine, mais prise primitivement à une *culture homogène* en bouillon glyciné. Une action prolongée de l'*acide lactique* (une heure) ou de l'*acide nitrique* (dix minutes) ne décolore nullement les bacilles tuberculeux. De même, les procédés de dégraissage préalable (procédé de Bunge et Trantenroth, procédé au sulfure de carbone) laissent les bacilles colorés en rouge.

III. **Cultures de tuberculose A.** — 1.) CULTURES HOMOGÈNES. — On a recherché l'acido-résistance de cultures jeunes de six jours ensemencées depuis plusieurs générations sur agar glyciné, mais prélevées primitivement sur des *cultures homogènes* en bouillon glyciné. Les préparations soumises à une « *décoloration prolongée* » (*acide lactique* pendant une heure ; *acide azotique* pendant dix minutes) ou à un « *dégraissage préalable* » (alcool absolu et acide chromique ; — sulfure de carbone) ont résisté moyennement à la décoloration par les acides : dans l'ensemble les bacilles restaient rouges ; cependant un commencement de décoloration s'était produit car on trouvait dans le champ du microscope quelques bacilles réfringents.

2. CULTURES HOMOGÈNES EN BOUILLON. — Nos recher-

ches ont porté ensuite sur des *cultures homogènes* de la tuberculose A du laboratoire, en *bouillon ordinaire*, âgées de 23 jours environ. Les bacilles ont montré une acido-résistance faible. Traitées par les procédés indiqués plus haut (acide lactique, acide azotique, procédé de Bunge et Trantenroth, sulfure de carbone), les préparations renfermaient de rares bacilles rouges et d'autres, plus nombreux, réfringents ou teintés en bleu pâle.

IV. **Résultats d'ensemble.** — On le voit par ce qui précède, les bacilles tuberculeux pris dans les produits pathologiques (crachats), ou cultivés depuis longtemps en milieu solide (agar glyciné) sont très réfractaires à la décoloration par les acides.

Dans des conditions identiques (cultures sur agar prélevées primitivement sur des cultures homogènes en bouillon), les bacilles de la tuberculose H semblent être plus acido-résistants que les bacilles de la tuberculose A du laboratoire.

D'une façon générale, les cultures homogènes, en bouillon, de bacilles tuberculeux offrent une résistance aux acides moindre que celles des cultures entretenues depuis longtemps en milieu solide. Cela confirme les résultats obtenus par MM. Arloing, P. Courmont, Nicolas [4, 5] : ces expérimentateurs ont vu en effet que les cultures jeunes sont faiblement acido-résistantes, la résistance à la décoloration augmentant par le vieillissement des cultures,

§ II. — *Réactions colorantes du bacille du smegma*

I. **Cultures solides sur agar glyciné.** — I. CULTURES ANCIENNES (4 à 6 mois).

a) COLORABILITÉ. — Traitées successivement par des solutions aqueuses de fuchsine (1 p. %) et de bleu de méthylène, les préparations du bacille du smegma ont montré des bacilles teintés en rouge clair.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le bacille du smegma, avec le procédé de Gram modifié par Nicolle, reste coloré en violet, prend le Gram. D'après Leyden, ce bacille ne prendrait pas le Gram ; d'après Grethe, le smegma-bacillus resterait coloré par la méthode de Gram. Ces divergences s'expliqueraient — d'après Bunge et Trantenroth — par ce fait que l'alcool employé comme décolorant, dans la méthode de Gram, fait perdre sa couleur au bacille du smegma. Si l'on emploie, disent ces mêmes auteurs, le procédé de Weigert, les bacilles du smegma prennent le Gram [13]. Dans nos expériences, nous avons employé l'alcool (alcool : 2 parties ; acétone : 1) et cependant le bacille du smegma a pris le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. — Procédés de « *décoloration prolongée* ». — Avec les *acides sulfuriques* (25 p. % : une heure), *chlorhydrique* (au 1/3 : une heure), *azotique* (au 1/3 : 10 minutes), *lactique* (une heure), les bacilles du smegma ont été complètement décolorés : leur couleur rouge était remplacée par une teinte bleu pâle due à l'action recolorante du bleu de méthylène.

Les acides minéraux (sulfurique, chlorhydrique, nitrique) nous ont permis de différencier — par leur degré différent de résistance à la décoloration — le bacille de Koch du smegma-bacillus. Au bout d'une heure, l'acide sulfurique au 1/4 et l'acide chlorhydrique au 1/3, qui sont sensiblement sans action sur le bacille tuberculeux,

ont décoloré les bacilles du smegma. L'acide nitrique au $1/3$ qui, au bout de 10 minutes, est sans action sur le bacille de Koch, fait disparaître la teinte rouge du bacille du smegma. Ces résultats sont contraires à l'opinion de Bunge et Trantenroth [13]. Pour différencier les deux espèces de bacilles, la durée d'action des acides minéraux présente d'assez grandes différences, facilement perceptibles : ainsi, avec l'acide nitrique, le bacille tuberculeux n'est pas complètement décoloré en trente minutes, alors que le bacille du smegma a perdu sa coloration rouge au bout de dix minutes. De même l'acide lactique (en solution alcoolique à 3 p. %) qui, au bout de trois heures, n'a pas complètement décoloré le bacille de Koch, a triomphé en une heure de l'acidorésistance du smegma-bacillus : il est vrai que dans ce cas (solution alcoolique d'acide lactique) c'est peut-être l'alcool qui agit surtout comme décolorant, le bacille du smegma étant, d'après Matterstock [13], Grethe [24], Léwy [38], très sensible à l'action de l'alcool.

« *Procédés de dégraissage préalable* ». — Avec le *procédé de Bunge et Trantenroth* (alcool absolu et acide chromique), les bacilles du smegma ont perdu toute leur résistance à la décoloration : ils apparaissent soit réfringents, soit teintés en bleu très pâle. C'est d'ailleurs au smegma-bacillus qu'a été tout spécialement appliqué le procédé indiqué par ces deux auteurs. D'après eux, il n'a jamais fait défaut pour le bacille du smegma [13]. Nous n'avons eu qu'à nous louer de ce procédé — un des meilleurs qui existent. Il permet de faire la diagnose différentielle entre le bacille de Koch qui reste coloré d'un beau rouge, et le bacille du smegma qui est déco-

loré. Le *dégraissage par le sulfure de carbone* a complètement décoloré les bacilles du smegma qui apparaissent en bleu.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — Nous avons recherché quel était le degré d'acido-résistance présenté par les cultures jeunes faites sur agar glyciné. Avec les « *procédés de décoloration prolongée* » (*acide lactique* : 1 heure, *acide nitrique* au 1/3 : 10 minutes), les bacilles du smegma ont présenté une acido-résistance moyenne : de nombreux bacilles apparaissaient en rouge, bien qu'un certain nombre fussent décolorés.

« *Procédés de dégraissage préalable* ». — Le *procédé de Bunge et Trantenroth* n'est pas arrivé à décolorer complètement le bacille du smegma : la plupart, sans doute, étaient teints en bleu, mais dans le champ du microscope, on apercevait çà et là de rares bacilles rouges. Le *dégraissage par le sulfure de carbone*, appliqué pendant quatre minutes, a complètement décoloré les bacilles du smegma en culture jeune.

Dans les cultures récentes, les bacilles du smegma semblent présenter une acido-résistance plus grande que dans les cultures vieilles.

II. Cultures liquides homogènes (âgées de 23 jours).

1. EN BOUILLON ORDINAIRE, le bacille du smegma présente une acido-résistance qui cède rapidement à l'*acide nitrique* au tiers (10 minutes), à l'*acide lactique* (1 heure) et aux *procédés de dégraissage* (*procédé de Bunge et de Trantenroth* ; *sulfure de carbone*) ; avec ces divers procédés on n'aperçoit plus de bacilles rouges.

2. BOUILLON GLYCÉRINÉ. — Le bacille du smegma est complètement décoloré par l'*acide lactique* agissant

pendant une heure : les bacilles apparaissent en bleu. L'*acide nitrique* en tiers agissant pendant dix minutes décolore presque complètement les bacilles : cependant on en voit encore de très rares colorés en rouge. Le *procédé de Bunge et de Trantenroth* (alcool absolu et acide chromique) décolore complètement le smegma-bacillus en bouillon glyciné. Le dégraissage au *sulfure de carbone* laisse encore apparaître un certain nombre de bacilles rouges, tout en décolorant le plus grand nombre d'entre eux.

En bouillon glyciné le bacille du smegma semble plus acido-résistant qu'en *bouillon ordinaire*.

§ III. — *Réactions colorantes du bacille de Rabinowitsch.*

(Trouvé dans la *gangrène pulmonaire*.)

Il s'agit d'un bacille acido-résistant rencontré dans les crachats d'un malade entré à l'Institut des Maladies infectieuses de Berlin avec le diagnostic de bronchite chronique [58]. Le malade mourut après avoir séjourné onze jours à l'hôpital. A l'autopsie on trouva un abcès gangréneux dans le lobe supérieur du poumon gauche.

Le bacille en question a été isolé et étudié par M. Rabinowitsch.

Cultures solides sur agarglyciné (âgées de 6 à 7 mois). — a) COLORABILITÉ (*Méthode de Giacomi* : colorabilité avec solution hydrique de fuchsine). — (Pour les détails, se reporter à l'article qui traite de la colorabilité du bacille tuberculeux). Les bactéries trouvées par Rabinowitsch se laissent colorer en rouge par le procédé ci-dessus.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le bacille de la gangrène pulmonaire, de L. Rabinowitsch, prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. — Nous avons appliqué à ce bacille « les *procédés de décoloration prolongée* ». Traités par les *acides sulfurique* (au $\frac{1}{4}$, 1 heure), *chlorhydrique* (au $\frac{1}{3}$, 1 heure), *nitrique* (au $\frac{1}{3}$, 10 minutes), *lactique* (1 heure), la plupart de ces bacilles étaient décolorés et apparaissaient réfringents ; çà et là les préparations montraient encore des bacilles teintés en rouge. En somme, l'acido-résistance du bacille de la gangrène pulmonaire est plutôt faible. Telle d'est pas l'opinion de Rabinowitsch : d'après cet auteur, le bacille résisterait autant que le bacille tuberculeux à la décoloration par les acides [58].

§ IV. — Réactions colorantes du bacille de la tuberculose bovine.

Nos recherches ont porté sur des échantillons de la *tuberculose bovine K*, du laboratoire.

Cultures homogènes (âgées de 23 jours). —

1. BOUILLON ORDINAIRE. — Nous avons recherché l'*acido-résistance* par les *procédés de décoloration prolongée* (*acide nitrique* au $\frac{1}{3}$, pendant 10 minutes ; *acide lactique*, pendant 1 heure) et par les « *procédés de dégraissage préalable* » (procédé de Bunge et Trantenroth, sulfure de carbone) : la plupart des bacilles étaient décolorés, de très rares bactéries se détachaient en rouge. En somme, en bouillon ordinaire (culture homogène), les bacilles de la tuberculose bovine sont faiblement acido-résistants..

2. BOUILLON GLYCÉRINÉ. — Soumis à une *décoloration prolongée* (acide nitrique, acide lactique) ou à un *dégraissage préalable*, les bacilles se sont montrés moyennement acido-résistants : un grand nombre étaient colorés en rouge ; cependant on percevait un commencement de décoloration.

§ V. — *Réactions colorantes du bacille pseudo-Perlsucht de Möller.*

(Trouvé dans les nodules tuberculeux des bovidés).

Cette bactérie (bacille de la *pseudo-Perlsucht* de la vache a été décelée par Möller [42] dans la profondeur des nodules de la *pommelière* (*Perlsucht*). Ce bacille est absolument différent du bacille tuberculeux.

Cultures solides sur agar glycérimé. — 1) CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois). — a) COLORABILITÉ (*Méthode de Giacomi*). — Traité par des solutions hydriques de fuchsine et de bleu de méthylène, le bacille de Möller a été coloré en rouge, alors que dans des conditions identiques les bacilles tuberculeux restent incolores.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Traité par le procédé de Gram-Nicolle, le bacille de la *pseudo-Perlsucht* prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — Traités par l'*acide sulfurique* au quart pendant une heure, les bacilles de Möller restent colorés en rouge pour la plupart ; on note, cependant, une décoloration commençante, car de nombreux bacilles apparaissent réfringents. Avec les *acides chlorhydrique* (au 1/3), *nitrique* (au 1/3), *lactique* (à 3 %),

l'acido-résistance est très faible : la plupart des bacilles sont décolorés, quelques uns cependant apparaissent en rouge.

« *Procédés de dégraissage préalable* ». — Avec le *procédé de Bunge et Trantenroth* l'acido-résistance du bacille de Möller est faible : quelques corps bacillaires apparaissent en rouge alors que l'ensemble est réfringent, incolore. Le *sulfure de carbone* décolore presque entièrement les bacilles en question : la majorité est teintée en bleu très net, quelques-uns cependant se détachent en rouge.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — D'une façon générale la résistance à la décoloration par les acides paraît être légèrement augmentée. On note seulement un commencement de décoloration avec les *procédés de décoloration prolongée* (acide nitrique, lactique) et le *dégraissage au sulfure de carbone* (acido-résistance moyenne). Le *procédé de Bunge et Trantenroth* (dégraissage par l'alcool et l'acide chromique) décolore presque complètement le bacille de Möller en cultures jeunes.

§ VI. — *Réactions colorantes du bacille du fumier*
(*Mistbacillus de Mæller*)

Cultures solides sur agar glycérimé (âgées de 6 à 8 mois). — a) COLORABILITÉ SIMPLE (*Méthode de Giacomi*). — Après l'action successive de solutions aqueuses de fuchsine et de bleu de méthylène, le *Mistbacillus* est coloré en bleu très pâle.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le bacille du fumier prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES « *Procédés de décoloration prolongée* ». — Le *Mistbacillus* présente une résistance moyenne à la décoloration par les *acides* (*sulfurique, chlorhydrique, nitrique, lactique*) : les bacilles sont rouges dans l'ensemble, mais la décoloration commence puisqu'un certain nombre apparaissent réfringents.

« DÉGRAISSAGE PRÉALABLE ». — Le *procédé de Bunge et Trantenroth* décolore complètement les bacilles du fumier qui apparaissent teintés en bleu. Avec le *sulfure de carbone*, la décoloration est moins complète, bien que très avancée : la plupart des bacilles sont bleus, un petit nombre seulement tranchent par leur couleur rouge.

§ VII. — Réactions colorantes du bacille du beurre de Rabinowitsch

Ce bacille a été découvert par Rabinowitsch dans le beurre de Berlin (56) : cette bactérie est très probablement la même que celle décrite par Petri (53, 17).

Cultures solides sur agar glycérimé. 1) CULTURES ANCIENNES (6 à 7 mois). — a) COLORABILITÉ. — Le bacille du beurre de Rabinowitsch se laisse colorer en rouge par une solution aqueuse de tuchsine.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Ce bacille prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — Si l'on fait agir les *acides sulfurique, chlorhydrique, lactique* pendant une heure sur les bacilles du beurre de Rabinowitsch, la plupart restent teintés en rouge ; on observe cependant un commencement de décoloration. Avec l'*acide nitrique* au tiers (10 minutes)

la décoloration est presque complète ; il ne reste plus que de rares bacilles rouges, la plupart apparaissant réfringents ou colorés en bleu très pâle.

2) CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance à la décoloration par les acides ne paraît pas subir de grandes variations. On note un commencement de décoloration avec l'*acide nitrique* au tiers agissant pendant dix minutes, alors que la décoloration est complète avec l'*acide lactique*. L'acide lactique semble être un agent de décoloration supérieur à l'acide nitrique, pour le bacille du beurre de Rabinowitsch en cultures jeunes.

§ VIII. — *Réactions colorantes du bacille de Korn,*
type I.

Décélé par cet observateur dans des échantillons de beurre
de Fribourg [31, 32].

Cultures solides sur agar glycérimé. 1) CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois). — a) COLORABILITÉ. — Le bacille I de Korn est coloré en rouge par une solution aqueuse de fuchsine.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Ce bacille prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédé de décoloration prolongée* ». — Les *acides sulfurique, chlorhydrique, nitrique* (employés dans les conditions indiquées au chapitre de la technique) exercent un commencement de décoloration sur le bacille I de Korn. L'*acide lactique* agissant pendant une heure produit une décoloration presque complète, la majorité des bacilles apparaissant réfringents.

« *Procédé de dégraissage* ». — Le *procédé de Bunge*

et Trantenroth décolore presque complètement les bacilles de Korn : la plupart apparaissent réfringents. Le *dégraissage par le sulfure de carbone* produit moins de résultats ; on n'obtient qu'un commencement de décoloration, quelques bacilles se détachent en bleu parmi le plus grand nombre qui sont restés rouges.

2) CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance à la décoloration semble augmenter vis-à-vis de l'*acide nitrique* et du *sulfure de carbone* (ces deux procédés sont sans action sur les bacilles I de Korn en culture jeune, qui restent tous colorés en rouge.) L'*acide lactique* semble avoir le même effet sur les cultures jeunes que sur les cultures vieilles (la plupart des bacilles étant décolorés.) Le *procédé de Bunge et de Trantenroth* décolore complètement les bacilles jeunes, alors qu'en cultures anciennes la décoloration est incomplète.

§ IX. — Réactions colorantes du bacille de Korn, type II

Ce bacille a été trouvé dans le beurre de Fribourg, [33] avec le bacille I du même observateur.

Cultures sur agar glycérimé (âgées de 6 à 7 mois).

a) COLORABILITÉ. — Le bacille II de Korn est coloré en rouge sous l'action d'une solution hydrique de fuchsine.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — L'*acide chlorhydrique* au tiers, agissant pendant une heure produit un commencement de décoloration. Celle-ci est presque absolue si l'on fait

agir les *acides sulfuriques* (au 1/4) et *lactique* (3 p. %) pendant une heure, ou l'*acide nitrique* au tiers pendant dix minutes ; la majorité des bacilles sont réfringents, quelques-uns à peine sont teints en rouge.

D'après Korn, le bacille II serait moins sensible à l'action de l'acide sulfurique que le bacille I [33]. Nos recherches nous ont fait constater le contraire.

2 X. Réaction colorante du bacille du beurre de Coggi

Coggi a découvert ce bacille en cherchant à déceler le bacille tuberculeux [14], dans des échantillons de beurre milanais.

Cultures sur agar glycérimé. — 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois).

a) COLORABILITÉ. — La fuchsine en solution aqueuse (méthode de Giacomi) colore en rouge le bacille de Coggi.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Ce bacille, traité par la méthode de Gram-Nicollé, n'a pas gardé sa coloration violette ; ne prend pas le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — Le bacille de Coggi, soumis à l'action des *acides sulfurique, chlorhydrique, nitrique* (dans les conditions que nous avons indiquées au chapitre de la technique) subit un commencement de décoloration ; dans l'ensemble, les bacilles sont rouges, mais on en voit un certain nombre décolorés et réfringents. Avec l'*acide lactique* (à 3 %) agissant pendant une heure, la décoloration est presque complète ; on n'aperçoit plus que quelques bacilles rouges, la plupart étant décolorés.

« *Procédés de dégraissage préalable* ». — Traités par le *procédé de Bunge et Trantenroth*, les bacilles de Coggi sont presque entièrement décolorés. De même, avec le *sulfure de carbone* : l'immense majorité des bacilles est colorée en bleu.

12. CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance à la décoloration n'a pas changé vis-à-vis de l'*acide azotique* (commencement de décoloration). Cette résistance a augmenté vis-à-vis du *dégraissage par le sulfure de carbone* : dans les cultures vieilles la décoloration était presque complète ; dans les cultures jeunes, la décoloration est nulle. Les cultures jeunes du bacille de Coggi résistent moins que les vieilles à la décoloration par l'*acide lactique* et par le *procédé de Bunge et Trantenroth*.

§ XI. — Réactions colorantes des bacilles de Tobler

Ces bacilles ont été découverts par Mme Tobler dans le beurre de Zurich [60].

A. **Bacille I de Tobler.** — CULTURES SUR AGAR GLYCÉRINÉ (6 à 7 mois).

a) COLORABILITÉ. — Le bacille I de Tobler se colore en rouge sous l'action d'une solution aqueuse de fuchsine.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Ce bacille prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée*. — Le bacille I de Tobler traité par les *acides* (*sulfurique, chlorhydrique, nitrique, lactique*) est entièrement décoloré ; les préparations ne renferment pas de bacilles rouges ; tous apparaissent en bleu pâle, reco-

lorés par le bleu de méthylène. Dans nos différentes recherches, nous avons constaté que le bacille I de Tobler est très faiblement acido-résistant ; cela ne concorde pas avec l'opinion de certains auteurs [18], qui considèrent ce bacille comme très acido-résistant.

B. Bacille II de Tobler. — CULTURES SUR AGAR GLYCÉRINÉ (âgées de 8 à 9 mois). — *a*) COLORABILITÉ. — La fuchsine en solution aqueuse colore ce bacille en rouge.

b) GRAM. — Le bacille II de Tobler prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée.* — Avec les *acides sulfurique et nitrique* on note un commencement de décoloration. Celle-ci est presque complète après l'action pendant une heure de l'*acide lactique* et de l'*acide chlorhydrique* ; l'ensemble des bacilles sont réfringents, un très petit nombre seulement tranchent par leur coloration rouge.

C. Bacilles III de Tobler. — CULTURES SUR AGAR GLYCÉRINÉ. — 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 7 mois): —

a) *Colorabilité* : ce bacille se laisse colorer en rouge par une solution aqueuse de fuchsine.

b) *Méthode de Gram.* — Le bacille III de Tobler prend le Gram.

c) « *Résistance aux acides* ». — *Procédé de décoloration prolongée.* Traitées par les *acides sulfurique, chlorhydrique, nitrique* les préparations du bacille III de Tobler présentent un commencement de décoloration. Avec l'*acide lactique*, la décoloration est absolue ; les bacilles apparaissent réfringents.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). Traitées par l'*acide lactique* (1 heure) ou par l'*acide nitrique* au tiers (10 minutes), les préparations présentent un commencement

de décoloration. D'après Tobler (60), le bacille III ne resterait coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen que pendant les deux premiers jours de son développement. Dans nos expériences, portant sur des cultures vieilles de six à sept mois, la plupart des bacilles restaient colorés après l'action des acides minéraux. Dans les cultures jeunes, la résistance du bacille III de Tobler, vis-à-vis de l'acide lactique, paraît être augmentée.

D. Bacille de Tobler, type IV. — I. Cultures solides sur gélose glycérinée. — 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 7 mois).

a) « *Colorabilité* ». — Bacilles colorés en rose par la fuchsine en solution hydrique.

b) « *Méthode de Gram* ». — Le bacille de Tobler, type IV, ne prend pas le Gram.

c) « *Résistance aux acides* ». — *Procédés de décoloration prolongée*. Les acides (sulfurique, chlorhydrique, azotique, lactique) agissant dans les conditions que nous avons plusieurs fois indiquées, arrivent à décolorer complètement les bacilles IV de Tobler. Ils apparaissent au microscope sous forme de bâtonnets réfringents analogues à des bacilles d'Eberth examinés sans coloration. D'après Tobler, le bacille IV résisterait bien à la décoloration par les acides (60).

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — Dans les cultures jeunes, la résistance aux acides ne paraît pas augmentée : les bacilles sont tous décolorés par l'action des acides azotique et lactique.

II. Culture en bouillon (incomplètement *homogènes*, âgées de 23 jours).

I. BOUILLON ORDINAIRE. — Les bacilles sont tous déco-

lorés, perdent leur teinte rouge quand on les traite par les *procédés de décoloration prolongée* (acides nitrique, lactique) ou par les *procédés de dégraissage préalable* (procédé de Bunge et Trantenroth ; dégraissage par le sulfure de carbone).

2. BOUILLON GLYCÉRINÉ. — Tous les bacilles sont décolorés avec les procédés indiqués ci-dessus.

Le bacille IV de Tobler est le moins résistant de ceux décrits par cet observateur.

E. **Bacille V de Tobler.** — CULTURES SUR AGAR-GLYCÉRINÉ. 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 7 mois). — a) « *Colorabilité* ». — Traité successivement par des solutions aqueuses de fuchsine et de bleu de méthylène, ce bacille est teinté en bleu.

b) *Méthode de Gram.* — Le bacille V de Tobler prend le Gram.

c) *Résistance aux acides.* — *Procédés de décoloration prolongée.* — L'action des *acides minéraux* (sulfurique, chlorhydrique, azotique) commence à décolorer les bacilles V de Tobler ; la plupart des bacilles sont rouges, un petit nombre apparaissent en bleu pâle.

Avec l'*acide lactique*, la décoloration est presque complète.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — Le bacille V de Tobler, en culture jeune, possède, vis-à-vis de l'*acide nitrique*, la même résistance que dans les cultures vieilles ; on observe seulement un commencement de décoloration. Le Tobler, type V est plus résistant, en culture jeune, à la décoloration par l'*acide lactique* ; alors qu'avec ce procédé les cultures vieilles présentaient une décoloration presque complète, les cultures jeunes ne subis-

sent qu'un commencement de décoloration, la plupart des bacilles gardant leur teinte rouge.

D'après Tobler, le bacille V perdrait son acido-résistance après deux jours de culture [60]. Dans nos expériences, nous avons observé des cultures de sept mois dont les bacilles gardaient encore la teinte rouge après l'action des acides.

Nos recherches nous ont montré que la résistance des bacilles de Tobler à la décoloration par les acides décroît progressivement avec les bacilles V, III, II, pour devenir presque nulle avec les bacilles I et IV.

§ XII. — Réactions colorantes du bacille du lait de Møller

Ce bacille (*Milchbacillus*) a été rencontré par Möller dans le lait de Belzig, près Berlin [42, 54].

Cultures sur agar glycérimé. — 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois).

a) COLORABILITÉ. — Ce bacille se laisse teinter en rouge très pâle sous l'action d'une solution aqueuse de fuchsine.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le *Milchbacillus* prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée* ». — L'action pendant une heure des *acides sulfurique, chlorhydrique, lactique* produit un commencement de décoloration : la plupart des bacilles sont rouges mais un certain nombre sont incolores, réfringents. L'*acide azotique* au tiers agissant pendant dix

minutes décolore presque entièrement les préparations du *Milchbacillus*.

« *Procédés de dégraissage préalable.* » Le dégraissage par le *procédé de Bunge et Trantenroth* ou par le *sulfure de carbone* décolore complètement les bacilles du lait, qui sont recolorés par le bleu de méthylène.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance du *Milchbacillus* à la décoloration est augmentée vis-à-vis de tous les procédés. L'*acide lactique*, le *dégraissage par le sulfure de carbone* ne produisent aucune décoloration. Celle-ci commence avec l'*acide nitrique*, est très avancée mais incomplète avec le *procédé de Bunge et Trantenroth*.

§ XIII. — Réactions colorantes du *Timotheebacillus* de Møller

Ce bacille (*Grasbacillus* I, bacille de la fléole) a été découvert par Möller sur une graminée, la fléole des prés (*phleum pratense*, *Timotheusgras*). [44, 54.]

Cultures solides sur agar glycérimé. — I. CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois).

a) COLORABILITÉ SIMPLE. — Le *Grasbacillus* I est coloré en bleu pâle après l'action successive de solutions aqueuses de fuchsine et de bleu de méthylène.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le *Timotheebacillus* prend le Gram.

c) RÉSISTANCE AUX ACIDES. « *Procédés de décoloration prolongée.* » — Les *acides sulfuriques* et *chlorhydrique* ne décolorent nullement les bacilles de la fléole. Les *acides nitrique* et *lactique* produisent un commence-

ment de décoloration : quelques bacilles apparaissent en bleu pâle, la majorité étant décolorés.

« *Procédés de dégraissage préalable* » : Le *procédé de Bunge et Trantenroth* décolore complètement les bacilles de la fléole qui apparaissent teintés en bleu. Le dégraissage au *sulfure de carbone* ne produit qu'un commencement de décoloration, quelques bacilles seulement se montrent avec une teinte bleue. D'après certains auteurs [18] le *Timotheebacillus* serait plus acido-résistant que le bacille de Koch : nos expériences nous ont montré que le bacille tuberculeux reste le premier des acido-résistants.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance à la décoloration n'a pas changé vis-à-vis de l'*acide lactique* et des *procédés de dégraissage préalable* (Bunge et Trantenroth ; — sulfure de carbone). En culture jeune, le *Timotheebacillus* ne se laisse plus décolorer par l'*acide nitrique*, alors que cet agent produisait un commencement de décoloration sur les cultures anciennes.

II. **Cultures en bouillon** (incomplètement homogènes, âgées de 23 jours). 1. BOUILLON ORDINAIRE. — Les bacilles sont tous décolorés, perdent leur teinte rouge par les *procédés de décoloration prolongée* (acides nitrique, lactique) ou par les *procédés de dégraissage préalable* (Bunge et Trantenroth ; — sulfure de carbone).

2. BOUILLON GLYCÉRINÉ. — L'*acide nitrique* et le *sulfure de carbone* ne produisent qu'un commencement de décoloration. — L'*acide lactique* et le *procédé de Bunge et Trantenroth* décolorent presque entièrement les bacilles de la fléole.

Dans l'ensemble le *Timothee-bacillus*, en culture

homogène, est moins acido résistant que dans les cultures solides. Dans les cultures homogènes elles-mêmes l'acido-résistance est plus grande en bouillon glycérimé qu'en bouillon ordinaire.

§ XIV. — *Réactions colorantes du Grاسبacillus II de Møller*

Ce bacille a été décelé par Möller dans la poussière de foin [45 54].

Cultures sur agar glycérimé. — 1. CULTURES ANCIENNES (6 à 8 mois).

a) COLORABILITÉ SIMPLE. — Ces bacilles restent réfringents après l'action de solutions aqueuses de fuchsine et de bleu de méthylène.

b) MÉTHODE DE GRAM. — Le Grاسبacillus II prend le Gram.

b) RÉSISTANCE AUX ACIDES. — *Procédés de décoloration prolongée* ».

L'acide sulfurique est sans action sur ces bacilles qui restent tous colorés en rouge. Les acides chlorhydrique et nitrique produisent un commencement de décoloration. Celle-ci est presque complète après l'action de l'acide lactique : la plupart des bacilles apparaissent réfringents. « *Procédés de dégraissage préalable* » : la décoloration est presque complète (rares bacilles rouges, la plupart sont en bleu) avec le sulfure de carbone ; elle est absolue avec le procédé de Bunge et Tranteroth : tous les bacilles sont recolorés en bleu.

2. CULTURES JEUNES (6 jours). — La résistance à la décoloration est restée la même avec le procédé de Bunge

et Trantenroth. Cette résistance a augmenté vis-à-vis du *sulfure de carbone* (ne produit plus qu'un commencement de décoloration) et de l'*acide nitrique* (ne décolore plus les bacilles). La résistance des cultures jeunes à la décoloration a diminué vis-à-vis de l'*acide lactique*, puisqu'elles se laissent complètement décolorer par cet agent.

§ XV. — Résumé

Nous allons, dans le tableau ci-dessous représenter l'ensemble de nos résultats. Les signes +, — désignent l'acido-résistance. Nous avons adopté la notation suivante :

+ + : Acido-résistance forte (tous les bacilles sont rouges).

+ : A. R. moyenne (commencement à décoloration : la plupart des bacilles sont rouges, quelques bacilles bleus apparaissent).

+ — : A. R. faible (décoloration presque complète : la plupart des bacilles sont bleus).

— : A. R. nulle (tous les bacilles sont bleus).

ESPÈCES	CULTURES ANCIENNES						CULTURES JEUNES			
	Agar glycériné						agar glycériné			
	SO ⁴ H ²	HCl	AzO ³ H	Acide lactique	Procédé de Bunge et Trantenroth	Dégraissage par CS ²	AzO ³ H	Acide lactique	Procédé de Bunge et Trantenroth	Dégraissage par CS ²
microbiennes										
Tuberculose humaine H (culture classique)	++	++	++	++	++	++				
Sinigma-bacillus.	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—
Bacille de la gangrène pulm. (Rabinowitsch)....	+	—	+	—	+	—				
Bacille pseudo-Perlucht.....	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—
Misthacillus,....	+	+	+	+	—	+	—			
Bacille du beurre (Rabinowitsch).	+	+	+	—	+		+	—		
Bacille de Korn : type I.....	+	+	+	+	—	+	++	+	—	++
Bacille de Korn : type II.....	+	—	+	+	—					
Bacille de Coggi.	+	+	+	+	—	+	+	—	—	++
B. de Tobler : type I.	—	—	—	—						
— type II.	+	+	—	+	—					
— type III	+	+	+	—			+	+		
— type IV	—	—	—	—			—	—		
— type V.	+	+	+	+	—		+	+		
Milchbacillus....	+	+	+	—	+	—	+	++	+	+
Timotheebacillus.	++	++	+	+	—	+	++	+	—	+
Grasbacillus .II..	++	+	+	+	—	+	++	—	—	+

TROISIÈME PARTIE

Exposé synthétique des résultats obtenus

I. **Colorabilité simple.** — Si l'on fait successivement agir des solutions aqueuses de fuchsine et de bleu de méthylène, le bacille de Koch reste réfringent. Dans les mêmes conditions, la plupart des autres acido-résistants prennent le rouge : cette coloration par la fuchsine est surtout très marquée pour les cinq bacilles de Tobler. Certains bacilles plus acido-résistants que la moyenne se laissent colorer par le bleu de méthylène plutôt que par la fuchsine : après l'action successive de ces deux solutions ils apparaissent teintés en bleu pâle (*Timothaeobacillus*, *Mistbacillus*).

II. **Méthode de Gram.** — Traités par la méthode de Gram-Nicollé, les bacilles acido-résistants que nous avons étudiés, restent colorés en violet, gardent le Gram.

Le bacille de Coggi et le bacille IV de Tobler font seuls exception et ne prennent pas le Gram.

III. Méthode de décoloration prolongée. — D'une façon générale, l'*acide chlorhydrique* au tiers et l'*acide sulfurique* au quart agissant pendant une heure, semblent des procédés peu actifs. L'*acide lactique* (en solution alcoolique à 3 p. %) agissant pendant une heure paraît être, dans l'ensemble, un décolorant supérieur à l'*acide azotique* au tiers agissant pendant dix minutes, (bacille du smegma en bouillon glyciné, bacilles II, III, V, de Tobler, bacille de Coggi, bacille du beurre de Rabinowitsch en culture jeune, bacille I de Korn). Dans certains cas cependant l'acide nitrique se montre plus actif que l'acide lactique (bacille du beurre de Rabinowitsch en culture ancienne, *Milchbacillus*).

IV. Méthode de dégraissage préalable. — Le *procédé de Bunge et Trantenroth* (dégraissage par l'alcool absolu et l'acide chromique), le dégraissage par le *sulfure de carbone* paraissent être des moyens de décoloration supérieurs aux acides (action prolongée). Le procédé de Bunge et Trantenroth est même plus actif que le dégraissage au sulfure de carbone (bacille I de Korn, bacille de Coggi en cultures jeunes, *Timotheebacillus*, *Grasbacillus* II). Les deux procédés de dégraissage indiqués ci-dessus, tout en étant plus actifs que les procédés de décoloration prolongée (acides), sont cependant moins brutaux : ils font disparaître plus facilement les substances grasses des bacilles et attaquent moins profondément le protoplasma microbien. Alors qu'après l'action prolongée des acides, les bacilles décolorés restent réfringents et ne prennent pas le

bleu (Grasbacillus II, Mistbacillus, bacille de la pseudo-Perlsucht de la Vache), le dégraissage préalable combiné à une décoloration rapide par les acides (procédé de Bunge et Trantenroth; sulfure de carbone) permet, en général, après la décoloration des bacilles, leur recoloration par le bleu de méthylène (Timotheebacillus, Grasbacillus II, Mistbacillus). Le dégraissage par le sulfure de carbone paraît exercer sur le protoplasma des bacilles une action encore moins brutale que le procédé de Bunge et Trantenroth. Avec ce dernier procédé certains bacilles, une fois décoiorés, peuvent rester refringents; avec le procédé au sulfure de carbone ils reprennent le bleu après décoloration (bacille de la pseudo-Perlsucht des bovidés, bacille I de Korn, bacille de Coggi).

V. Influence de l'âge des cultures sur la résistance à la décoloration. — On a dit que certains bacilles sont plus acido-résistants dans les cultures jeunes que dans les cultures anciennes. Nous avons constaté cela pour certaines espèces : le Milchbacillus de Möller, le bacille de la pseudo-Perlsucht des bovidés nous ont paru offrir plus de résistance à la décoloration, dans les cultures jeunes. Mais le plus souvent l'âge des cultures ne fait pas varier d'une façon simple l'acido-résistance. Le plus souvent, dans les cultures jeunes, la résistance à la décoloration augmente vis-à-vis de certains procédés et diminue vis-à-vis des autres. C'est ainsi qu'en cultures jeunes, le bacille I de Korn, le Grasbacillus II se laissent moins décolorer par l'acide nitrique ou le sulfure de carbone; le Timotheebacillus est plus réfractaire à l'action de l'acide nitrique, le bacille de

Coggi est plus résistant vis-à-vis du sulfure de carbone; les bacilles III et V de Tabler, vis-à-vis de l'acide lactique. Mais aussi, en culture jeunes, le bacille I de Korn résiste moins au procédé de Bunge et Trantenroth; le bacille de Coggi se laisse décolorer davantage par ce procédé et par l'acide lactique; le *Grasbacillus* II est moins résistant vis-à-vis de l'acide lactique. Comme on peut le voir par cette courte énumération, l'âge des cultures exerce une action très variable sur la résistance, à la décoloration, des bacilles dits acido-résistants.

Quant au bacille tuberculeux humain, on sait déjà qu'au contraire et d'une façon constante les bacilles très jeunes sont facilement décolorables par les acides, tandis que les cultures âgées sont acido-résistantes au maximum. Le fait a été observé pour les cultures homogènes par MM. Arloing et P. Courmont [4, 5], et pour les cultures en voile sur bouillon par Marmorek (40).

VI. Influence de l'état physique (*solide liquide homogène*) des cultures et du milieu sur la résistance à la décoloration. — D'une façon générale, les bacilles cultivés en milieu solide (agar glycériné) sont plus acido-résistants que les bacilles des cultures homogènes (*Timotheebacillus* bacille de Koch).

Parmi les cultures homogènes elles-mêmes, celles en bouillon glycériné paraissent plus acido-résistantes que celles en bouillon ordinaire (Bacille de la tuberculose bovine K, bacille du smegma, *Timotheebacillus*.)

VII. Acido-résistance des cultures faites en milieu gras. — Nous avons cherché l'influence que les milieux riches en substances grasses exercent sur

l'acido-résistance. Des bacilles non acido-résistants (bacille d'Eberth, coli-bacille, bacillus subtilis, bacille non résistant italien Il trouvé par Coggi dans le beurre en même temps que son bacille acido-résistant) ont été cultivés dans des tubes de lait pendant une durée qui variait de treize à vingt-trois jours. Au bout de ce temps, les bacilles traités par la méthode de Ziehl-Hauser, n'ont pas montré la moindre acido-résistance. D'autre part, certains bacilles, peu acido-résistants, tels que les bacilles I et IV de Tobler, cultivés dans le lait pendant la même durée de temps, n'ont pas eu leur acido-résistance augmentée par ce passage dans un milieu riche en substances grasses.

La résistance à la décoloration par les acides, l'acido-résistance semblent être dûes à des propriétés biologiques spéciales du protoplasma microbien. Les bacilles acido-résistants élaborent probablement les principes qui les caractérisent, se livrent à une véritable synthèse de substances grasses. Ce qui semble le prouver, c'est que l'ensemencement en milieu glycérimé donne aux bacilles une acido-résistance plus considérable que les cultures en bouillon ordinaire, simplement salé et peptoné. D'autre part, le lait (riche en substances grasses toutes formées, qu'on retrouve ensuite dans le beurre) n'augmente pas ou ne crée pas l'acido-résistance chez les bacilles.

On peut s'expliquer de trois façons différentes la résistance que les bacilles opposent à la décoloration :

a) Ou bien l'acido-résistance résulte d'un simple phénomène physique : enrobement dans un milieu gras (lait, beurre).

b) Les bacilles s'assimileraient une graisse qui existe déjà formée dans le milieu où ils vivent.

c) Ils produisent par synthèse, aux dépens d'autres substances, la substance grasse à laquelle ils doivent leur acido-résistance.

Il semble que cette troisième hypothèse soit plus conforme à la réalité des faits : l'acido-résistance est produite par l'activité biologique propre du protoplasma microbien.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'action des procédés suivants :

1° Décoloration par les acides (sulfurique, chlorhydrique, azotique, lactique).

2° Dégraissage préalable par différents procédés (procédé de Bunge et Trantenroth ; — procédé personnel au sulfure de carbone) :

Sur les différents bacilles ci-dessous :

1° Bacille de la tuberculose humaine (crachats ; culture de tuberculose H. et de tuberculose A. du laboratoire.)

2° Bacille du smegma ;

3° Bacille de la gangrène pulmonaire (Rabinowitsch) ;

4° Bacille de la pseudo-Perlsucht de la vache (Möller) ;

5° Mistbacillus (Möller) ;

6° Bacille du beurre (Rabinowitsch) ;

7° Bacilles de Korn (types I et II) ;

8° Bacille de Coggi ;

9° Bacilles de Tobler (types I, II, III, IV, V) ;

10° Milchbacillus (Möller) ;

11° Timotheebacillus (Möller) ;

12° Grasbacillus II (Möller).

Les conclusions auxquelles nous ont conduit nos expériences, sont les suivantes :

I. — Les bacilles dits acido-résistants sont réfractaires à la décoloration, à des degrés très différents, suivant le procédé employé, suivant l'âge des cultures et le milieu où elles poussent. Dans ces diverses conditions la résistance à la décoloration varie de façons très diverses et non point d'une façon simple. Dans l'ensemble, les procédés basés sur le mode d'action des colorants, sur le degré de résistance aux acides, ne sont pas pratiques pour différencier le bacille de Koch des autres acido-résistants. Cela résulte de nos expériences personnelles, c'est aussi la conclusion de Grethe [24], de Bunge et Trantenroth [13]. Très souvent, on n'observe pas la décoloration absolue d'une espèce donnée. On trouve seulement que, dans ce cas, la décoloration est plus marquée que celle d'une préparation-témoin de bacilles de Koch ; cela se traduit par un plus (bacilles tuberculeux) ou moins grand nombre (autres acido-résistants) de bacilles colorés en rouge : une telle distinction ne peut être utilisée au point de vue clinique.

II. — Les rapports du bacille de Koch avec les divers acido-résistants sont très complexes. Cultivé sur milieu solide ou pris dans des produits pathologiques, le bacille de Koch demeure le premier des acido-résistants. Mais dans certaines conditions, sa résistance à la décoloration diminue : c'est ce qui se produit dans les cultures homogènes [4, 5] et ce qui tend à rapprocher à ce point de vue, les bacilles tuberculeux des autres acido-résistants. Les uns et les autres possèdent des propriétés de coloration qui dénotent une structure

identique. C'est actuellement la seule conclusion à laquelle on puisse s'arrêter. Il serait téméraire d'aller plus loin et de considérer les bacilles acido-résistants comme les ancêtres saprophytes du bacille de Koch. Comme le dit Borrel [11] « les relations des bacilles para-tuberculeux et des tuberculeux véritables restent dans le « domaine des spéculations métaphysiques. La question des bacilles tuberculeux et para-tuberculeux « menace d'exercer encore longtemps la patience des « bactériologistes, comme la question des typhiques et « des para-typhiques, ou celle des vibrions cholériques « et des vibrions des eaux, ou celle des diphtériques « et des pseudo-diphtériques. En l'absence de caractère meilleur, la production d'une tuberculine spécifique facile à mettre en évidence par l'injection chez « le cobaye tuberculeux, même à dose très faible (voie « sous-cutanée ou intra-cérébrale), nous paraît jusqu'à « maintenant rester le meilleur caractère de différenciation. » A ce procédé de différenciation, nous ajoutons l'agglutination (séro-diagnostic tuberculeux de MM. Arloing et P. Courmont) [16].

Le Président de la Thèse,
ARLOING.

Vu :
Le Doyen,
LORTET.

Vu :
PERMIS D'IMPRIMER :
Lyon, le 25 Novembre 1904.
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
GABRIEL COMPAYRÉ.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ALVAREZ et TAVEL. — Recherches sur le bacille de Lustgarten (Archives de Physiologie, 1885).
2. ARLOING (S.). — Leçons sur la tuberculose et certaines septicémies, Paris, 1892, Asselin et Houzeau.
3. ARLOING (S.). — Académie de médecine, 1901. — Presse Médicale, 12 février 1902. Congrès de Berlin, octobre 1902.
4. ARLOING et P. COURMONT. — Le séro-diagnostic de la tuberculose (Gazette des Hôpitaux, 1^{er} décembre 1900, p. 1467).
5. ARLOING et P. COURMONT. — Transformation du bacille de Koch, d'origine humaine, en une variété possédant la plupart des attributs du bacille de la tuberculose aviaire (Congrès général de médecine, Paris, 1900, section de bactériologie, p. 175).
6. BEHRING (E. Von). — Deut. med. Woch. N° 39, 24 sept., 1903, S. 689.
7. BEHRING (E. Von). — Semaine Médicale, 1904, n° 4, p. 29. — 1903, n° 39, p. 323.
8. BEHRING (E. Von). — Presse Médicale, 1903, n° 79, p. 698.
9. BIEDERT. — Deut. med. Zeitschr., 1886, nos 42 et 43. — 1891, n° 2, p. 32.
10. BIENSTOCK. — Zur Frage der sogenannten Syphilis-bacillen und der Tuberkelbacillenfärbung (Fortschr. der Medizin, 1896, p. 196).
11. BORREL. — Bacilles tuberculeux et para-tuberculeux (Bulletin de l'Institut Pasteur, 1904, nos 10, 11, 12.)

12. BULLOCH, ADAMI, WEENEY, MARMOREK, KOSSEL. — The morphological and physiological variations of the bacillus T. and its relations (a) to other Acid-proof bacilli and (b) to the Ray-Fungus and other streptothrix (The Lancet, juillet 1901, vol. CLXI, p. 242.)
13. BUNGE et TRANTENROTH. — Smegma und Tuberkelbacillen (Fortschritte der Medizin, 1896, nos 23, 24, p. 900, 929).
14. COGGI. — Sulla presenza di bacilli tobercolari nel burro di mercato di Milano (Giornale del. reale Societa italiana d'igiene, juillet 1899, n° 7, p. 289.)
15. COURMONT (J.). — Précis de Bactériologie, 2^e éd., 1903, Paris, Doin.
16. COURMONT (P.). — Les bacilles acido-résistants et le diagnostic de la tuberculose, Lyon Médical, 1904, n° 4, p. 165.
17. COURMONT (P.) et POTET. — Les bacilles acido-résistants du beurre, du lait et de la nature, comparés au bacille de Koch (Arch. de Méd. Ex. et d'Anat. path., janvier 1903, p. 83).
18. CROUZON et VILLARET. — Les bacilles pseudo-tuberculeux (Revue de la Tuberculose, tome X, n° 2, juillet 1903.)
19. CZAPLEWSKI. — Zur Kenntniss der Smegmabacillen (München. Med. Woch., 1897, n° 43.
20. DIETRICH. — Säurefeste Bakterien in einer Vereiterten ovarial-kyste (Berl., Kl., W., 1899, n° 9, p. 189.)
21. FOLLI. — Bacilli resistenti agli acidi nelle gangrene (Riforma medica, 27 août 1901, p. 591).
22. FRÆNKEL. — Einige Bemerkungen über das Vorkommen von Smegmabacillen in Sputum (Berlin, Kl., Woch., octobre 1898, n° 40, p. 880.)
23. GOTTSTEIN. — Die Beeinflussung des Färbenverhaltens von Microorganismen durch Fette (Fortschr. der Medizin, 1886, p. 252.)
24. GRETHE. — Smegma und Tuberkelbacillen (Fortschritte der Medizin, 1^{er} mai 1896, n° 9, p. 329.)

25. HAUSER. — Note sur la coloration du bacille de la tuberculose (Bulletin de la Société de Biologie, 29 octobre 1898.)
26. HAUSER. — A propos de la coloration rapide du bacille de la tuberculose (Presse Médicale, 1900, I, 117.)
27. IZQUIERDO. — Spaltpilze bei der Verruga peruana (Virchow's, Archiv. XIC, 1885, p. 411).
28. KARLINSKI. — Zur Kenntniss der Säurefesten Bakterien (Centr. f. Bakt. 1^{re} partie, vol. XXIX, avril 1901, n° 12, p. 521).
29. KOCH (R.). — Die Aetiologie der Tuberkulose (Mittheilungen aus dem Kais. Gesundheitsamte, vol. II, 1882, p. 1).
30. KOCH. — Die Aetiologie der Tuberkulose (Berlin 1884).
31. KORN (O.). — Zur Kenntniss der säurefesten Bakterien (Centr. f. Bakt, 1^{re} partie, vol. XXV, 1899, p. 532).
32. KORN (O.). — Tuberkelbacillenbefunde in der Markbutter (Archiv. f. Hyg. 1899, vol. XXXVI, p. 57 ; Oldenburg, München, und Leipzig).
33. KORN. — Weitere Beiträge zur Kenntniss der Säurefesten Bakterien (Centr. f. Bakt. 1^{re} partie, vol. XXVII, 1900, p. 481).
34. LASER. — Ueber Reinkulturen der Smegmabacillen (Münch. med. Woch. 1897, n° 43).
35. LEHMANN et NEUMANN. — Bakteriologie und bacteriologische Diagnostik (in octavo), 1899, Verlag von Lehmann.
36. LESIEUR. — Coloration du bacille de la tuberculose (Lyon Médical, 1899, tome 90, p. 97).
48. NICOLLE. — Pratique des colorations microbiennes (Annal. de l'Institut. Pasteur, 1895, p. 664).
37. LETULLE. — Histologie pathologique de la Verruga péruvienne (Mémoires de la Société de biologie, 16 juillet 1898, p. 764).
38. LÉWY. — Ueber Syphilis und Smegmabacillen (Thèse inaugurale, 1899, Neuwied-Louis Heuser).

39. MACÉ. — *Traité pratique de bactériologie*, 5^e édition, 1904, Baillière, Paris.
40. MARMOREK. — Contribution à l'étude de la culture et des réactions colorantes du bacille tuberculeux (13^e Congrès Médical International, 1900. Section de bactériologie, page 71).
41. MARTIN (H.). — *Recherches anatomo-pathologiques et expérimentales sur la tuberculose*, Thèse Paris, 1879.
42. MÖLLER (A.). — Ueber die Beziehungen der Tuberkelbacillen zu den andern Säurefesten Bakterien und zum Strahlenpilze (Centr. f. Bakt. 1^{re} partie, vol. XXX, 1901, n^o 14, p. 513). Rapport au Congrès de Londres, (1901).
43. MÖLLER. — Mikroorganismen die den Tuberkelbacillen verwandt sind und bei Thiere eine miliare Tuberkelkrankheit verursachen (Deutsch. med. Woch. juin 1898, n^o 24, p. 376).
44. MÖLLER. — Ueber dem Tuberkelbacillus verwandte Mikroorganismen (Therapeutische Monatshefte, novembre 1898, 12^e année, p. 607 ; Berlin, Verlag von J. Springer).
45. MÖLLER. — Ein neuer Säure und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe, welcher echte Verzweigungsformen bildet (Cent. f. Bakt. 1^{re} partie, vol. XXV, 1899, n^o 11, p. 369).
46. MÖLLER. — Ueber Mikroorganismen, welche sich morphologisch und tinctoriel wie der Tuberkelbacillus verhalten (Görbersdorfer Veröffentlichungen, 1898, Heft I, p. 168 ; Stuttgart, Verlag von F. Enke).
47. NEELSEN. — Coloration du bacille de Koch (Fortschr. der Medizin, 1885, p. 200, en note).
49. NICOLLE. — Note sur la bactériologie de la Verruga du Pérou (Annales de l'Institut Pasteur, 1898, p. 591).
50. NIKITINE. — Contribution à la théorie de la coloration des bacilles tuberculeux (Société de bactériologie de Moscou, 28 avril 1901).

51. ODRIOZOLA. — La Verruga Péruvienne (Presse médicale, 2^e semestre 1898, p. 41).
52. PAPPENHEIM. — Befund von smegmabacillen im Menschlichen Lungenauswurf (Berlin. Klin. Woch., septembre 1898, n^o 37, p. 809).
53. PETRI. — Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch (Hyg. Rundsch, 15 août 1897. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, t. XIV, 1898, p. 1 ; Verlag. von J. Springer, Berlin).
54. POTET (M.). — Etude sur les bactéries dites acidophiles : les paratuberculibacilles. Thèse, Lyon, 1902.
55. RABINOWITSCH (L.). — Recherche des bacilles tuberculeux dans le beurre (Deut. med. Woch., n^o 26, 1897).
56. RABINOWITSCH (L.). — Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Markbutter (Zeitschr. f. Hyg. 1897, vol. XXVI, p. 90).
57. RABINOWITSCH (L.). — Die Infectiosität der Milch, etc. Zeitschr. f. hyg., vol. XXXVII, 1901, p. 439).
58. RABINOWITSCH (L.). — Befund von säurefesten bakterien bei Lungengangrän (Deut. méd. Woch., avril 1900, 1 vol. n^o 16).
59. STOLZ. — Ueber einen Bacillus mit Verzweigungen (Arch. f. hyg., vol. XXX, 1897, p. 156).
60. TOBLER (A). — Beiträge zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen, etc. (Zeitschr. f. hyg. und Inf., XXXVI, janvier 1901).
61. VILLEMIN. — Bulletin de l'Académie de Médecine (5 décembre 1865.-1866).
62. VILLEMIN. — Etudes sur la tuberculose, p. 589 (Paris 1868, Bailliére).
63. ZIEHL. — Zur Färbung der Tuberkelbacillen (Deut. méd. Wochenschr., 1888, p. 451).
64. ZIEHL. — Ueber die Färbung der Tuberkelbacillen (*Ibid.*, 1883, p. 247).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	7
PREMIÈRE PARTIE. — Technique : méthode et différents procédés	14
CHAPITRE I. — Méthode.....	14
CHAPITRE II. — Procédés ordinaires de coloration des bacilles acido-résistants.....	16
CHAPITRE III. — Procédés de décoloration prolongée pour mesurer l'acido-résistance	20
CHAPITRE IV. — Procédés de dégraissage préalable pour mesurer l'acido-résistance.....	23
DEUXIÈME PARTIE. — Des degrés de résistance à la déco- loration de chacun des bacilles dits « acido-résis- tants »	27
RÉSUMÉ.....	52
TROISIÈME PARTIE. — Exposé synthétique des résultats obtenus.....	54
CONCLUSIONS.....	60
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	63

